家蝇抗菌肽 Diptericin 基因的克隆与分析

柳峰松*, 王丽娜, 唐 婷, 李 伟
(河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

摘要: Diptericin 是抗菌肽家族中的一员, 在昆虫先天免疫系统中起着重要作用。本研究通过 EST 序列筛选并结合 RACE 技术克隆了家蝇 *Musca domestica* 的 Diptericin 基因(*Md-Diptericin*, *MdDpt*)cDNA 序列, GenBank 登录号为 FJ794602。其全长 410 bp, 包含一个 300 bp 的完整开放阅读框(ORF), 推导的氨基酸序列 C 端富含甘氨酸, N 端富含脯氨酸, 同源性分析表明, 它与厩蝇 *Stomoxys calcitrans* 的 Diptericin A mRNA 相似性最高(identity = 74%)。以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建的系统关系表明, 家蝇 Diptericin 与其他双翅目昆虫的 Diptericin 起源于共同的祖先, 属于 Attain_C 超家族(Attacin_C superfamily)。基因定量分析表明, 大肠杆菌刺激后 6 ~ 12 h, 家蝇幼体 *MdDpt* 表达出现明显上调。结果提示 *MdDpt* 基因在家蝇免疫防御过程中起着重要作用。

关键词: 家蝇; 抗菌肽; 双翅肽; *Md-Diptericin* (*MdDpt*); 半定量 RT-PCR
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)10-1078-05

Cloning and characterisation of the diptericin gene in *Musca domestica*

LIU Feng-Song*, WANG Li-Na, TANG Ting, LI Wei (College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071001, China)

Abstract: Diptericin gene is a member of the antimicrobial peptide family, and plays a key role in insect innate immune system. In this study, a cDNA of 410 bp encoding for a diptericin was cloned from housefly (*Musca domestica*) by RACE based on dbEST information, which contains a 300 bp open reading frame (ORF) and was named *Md-Diptericin* (*MdDpt*) with the GenBank accession no. FJ794602. The C-terminal of the deduced peptide consists of a glycine-rich domain, while the N-terminal consists of a proline-rich domain. The result of sequence alignment analysis showed that this gene shares 74% identity with *Stomoxys calcitrans*. In addition, the phylogenetic analysis also indicated that the diptericin from housefly was in the same branch with those of other species, suggesting that they originated from the same ancestor and belong to Attacin_C superfamily. Analysis of quantitative RT-PCR indicated that, after challenged with *Escherichia coli*, the mRNA level of *MdDpt* in fly larvae was up-regulated and significantly higher than that of the blank control at 6 h to 12 h post-challenge. These results suggest that *MdDpt* plays an important role in fly defensive system.

Key words: *Musca domestica*; antibacterial peptide; diptericin; *Md-Diptericin* (*MdDpt*); semi-quantitative RT-PCR

抗菌肽(antibacterial peptide)是最早发现于昆虫体内的一类免疫效应因子, 在机体先天免疫中起重要作用。昆虫被病原体感染后, 能快速合成大量抗菌肽, 迅速杀灭入侵病菌, 阻止病菌的继续侵染。昆虫抗菌肽具有分子量小、结构稳定、水溶性好和广谱抗菌的特点, 不仅对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌有抑制作用, 还具有抗真菌、原生动物、病毒乃至抑制癌细胞的功能(Mohammad *et al*., 1995)。家蝇 *Musca domestica* 是世界性分布的双翅目昆虫, 从幼虫到成虫均表现出很强的环境适应能力, 所以家蝇必然具有完善而高效的免疫防御机制。家蝇体内存在某些广谱的抗菌活性物质, 目前在家蝇中已鉴定的抗菌肽主要有 3 类: 防御素(defensin)(王来城等, 2003)、攻击素(attacin)(耿华等, 2004)和天蚕素(cecropin)(金小宝等, 2004)。其中 Attacin 属于 Attain_C 超家族(Attacin_C superfamily), 此基因家

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2008000596)
作者简介: 柳峰松, 男, 1976 年生, 河北任丘人, 副教授, 从事无脊椎动物分子免疫学研究
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: liufengsong@ hbu. edu. cn
收稿日期 Received: 2009-04-07; 接受日期 Accepted: 2009-06-27

族还包括双翅肽（diptericin）和麻蝇素（sarcotoxin）两类抗菌肽（Hedengren *et al*.，2000）。本文根据 dbEST 数据库登录的一条家蝇 EST 序列（GenBank accession no.：ES608652），通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆到一条新的家蝇抗菌肽 Diptericin 基因——*MdDpt*（GenBank accession no.：FJ794602），并对其在家蝇免疫应答中的调控过程进行了研究。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　昆虫来源：家蝇 *Musca domestica* 种蝇由中国科学院动物研究所何凤琴老师惠赠，幼虫由本实验室饲养，饲养温度 25℃，相对湿度 50% ~70%。

1.1.2　主要试剂：TRNzol、DNA 回收试剂盒、pGM-T 载体为 TIANGEN 公司产品，M-MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶以及合成的引物均为南京金思特科技有限公司产品。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 提取和反转录：按照翟朝阳等(1996)的方法，用微生物刺激家蝇：取若干家蝇 3 龄幼虫，经新鲜培养的大肠杆菌菌液（OD_{600} = 0.6）浸泡 10 min 后，用带有大肠杆菌的针刺家蝇幼虫，在 6，12，24，48 和 72 h 后各取 3 头分别提取总 RNA。RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测后，各取 1 μg 总 RNA，按照报道的方法（Liu *et al*.，2005）以 AOLP [5′-GGCCACGCGTCGACTAGTACT$_{16}$ (G/A/C)-3′] 为引物反转录合成 cDNA。

1.2.2　家蝇 Diptericin 的 cDNA 片段克隆：根据 EST 序列设计正向引物 DptF1（5′-CTGAGTCAATTGTAGAACAACAAAAT-3′）和反向引物 DptR1（5′-TTACCATCTGTAGGTGTAAA-3′），以家蝇幼虫 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，PCR 反应条件为：94℃ 预变性 4 min；94℃ 40 s，52℃ 30 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经电泳回收纯化后，连接 pGM-T 载体并转化 DH5α 感受态细胞，蓝白斑和 PCR 筛选阳性克隆后测序。

1.2.3　家蝇 Diptericin 基因 3′末端的克隆：采用 RACE 技术，根据获得的家蝇 Diptericin cDNA 片段设计引物 DptF2（5′-CGACGATAAGTCACAGCCAC-3′），利用 cDNA 为模板，以外侧引物 DptF1 和 cDNA 末端接头引物 AP（5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′）进行 PCR 扩增，然后以第一轮 PCR 产物为模板，以 DptF2 和 AP 为内侧引物进行巢式 PCR 扩增，两次反应均采用相同的递减式（Touchdown）PCR：94℃ 预变性 4 min；94℃ 40 s，60℃ 40 s（退火温度每一循环降低 1℃），72℃ 1 min，10 个循环；94℃ 40 s，50℃ 40 s，72℃ 1 min，25 个循环；72℃ 延伸10 min。PCR 产物回收测序。

1.2.4　家蝇 Diptericin 基因序列分析：将上述测序结果进行拼接，利用 Blastn 程序在核酸数据库中进行相似性比对。Bioedit 软件搜索开放阅读框并翻译成氨基酸序列。应用 EXPASY Molecular Biology Server 上的 ProtParam 程序对推导的多肽序列进行分析。利用 MEGA 4.0 软件对昆虫 Diptericin、Attacin 和 SarcotoxinⅡ等多肽序列进行多序列比对，通过 NJ 方法构建分子系统树。

1.2.5　大肠杆菌刺激后家蝇 Diptericin 基因表达量的检测：取大肠杆菌刺激后家蝇幼虫 cDNA：取若干家蝇 3 龄幼虫，经新鲜培养的大肠杆菌菌液（OD_{600} = 0.6）浸泡 10 min 后，用蘸有大肠杆菌的针刺家蝇幼虫，在 6，12，24，48 和 72 h 后 5 个取样点各取 3 头，并以未刺激家蝇幼虫为空白对照分别提取总 RNA。以家蝇 β-actin 基因作为内参，利用半定量 RT-PCR 检测家蝇 Diptericin 基因表达量的变化。多重 PCR 体系中同时加入内参引物 ActF（5′-TCCGGTCGTACCACCGGTAT-3′）、ActR（5′-GAGATCCACATCTGCTGGAA-3′）和目的基因引物 DptF2、DptR1，扩增条件：94℃ 预变性 4 min，94℃ 30 s，54℃ 40 s，72℃ 延伸 1 min，26 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳，凝胶成像系统采集图片，运用 Quantity One 软件对电泳条带进行分析，以目的基因与内参基因条带灰度的比值作为家蝇 Diptericin 基因的相对表达量。利用 SPSS11.0 统计学软件对实验数据进行处理分析，采用 *t* 检验，检验水准 α = 0.05，实验结果以均数 ± 标准差表示。

2　结果

2.1　家蝇 Diptericin cDNA 的克隆及序列分析

以 DptF1 和 DptR1 为引物进行 PCR 扩增，得到一条约 320 bp 的片段，3′RACE 得到了一条约 330 bp的片段，将测序结果进行拼接得到一条 410 bp的 cDNA 序列，在 NCBI 进行 Blastn 比对的结果提示，所得序列与厩蝇 *Stomoxys calcitrans* 的

Diptericin A mRNA 具有最高相似性(74%)，于是将此基因命名为 *Md-Diptericin*（*MdDpt*）。分析发现 *MdDpt* cDNA 序列包含一个 300 bp 完整的开放阅读框(ORF)，PolyA 尾上游 29 个核苷酸处存在典型的加尾信号 AATAAA(图 1)。

根据 ORF 推导的 *MdDpt* 多肽由 99 个氨基酸残基组成，SignalP3.0 程序预测 N 端包括 20 个氨基酸残基的信号肽，*MdDpt* 成熟肽由 79 个氨基酸残基组成，理论分子量为 8.79 kD，理论等电点为 8.27。从氨基酸的组成上看，*MdDpt* 成熟肽富含 Gly(15.2%)、Asp(11.4%)和 Pro(10.1%)，氨基酸序列与其他蝇类 Diptericin 氨基酸序列具有较高相似性(图 2)。利用 MEGA 4.0 软件对以下昆虫的 Diptericin、Attacin 和 Sarcotoxin Ⅱ 等多肽序列进行多序列比对：家蝇 *Musca domestica* 的 Diptericin (FJ794602)和 Attacin(AAY59540)；新陆原伏蝇 *Protophormia terraenovae* 的 Diptericin(CAB57822)；棕尾别麻蝇 *Sarcophaga peregrina* 的 4 种不同 Sarcotoxin Ⅱ (BAA14184、BAA14183、BAA14185、AAA29987)；黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 Attacin A (NP_523745)、Attacin B (AAF58214)、Diptericin A(AAA28466)、Diptericin B(AAK17201)；家蚕 *Bombyx mori* 的 Attacin A(AAB34519)；烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 Attacin A(AAY82587)和 Attacin B(AAO74640)等。聚类分析表明进行比对的昆虫的 Diptericin 与 Attacin/Sarcotoxin Ⅱ 家族成员明显的分成两个群(图 3)。

```
1     CTG AGT CAA TTG TAG AAC AAC AAA [ATG] AAA TAT CTC TGT GCC ATT   45
                                      Met Lys Tyr Leu Cys Ala Ile   7
46    GTT CTC TTG TGC GCT CTA AGT GCA ACA TTT GTG GTT GCC GAC GAT   90
8     Val Leu Leu Cys Ala Leu Ser Ala Thr Phe Val Val Ala Asp Asp   22
91    AAG TCA CAG CCA CCT CCA CCA CAA ATT AAG GAC CCC CAA GTC CGT   135
23    Lys Ser Gln Pro Pro Pro Pro Gln Ile Lys Asp Pro Gln Val Arg   37
136   GTC GAT GTG GGA GGC TCT CCC AAG GAT GGT TAC AAT GTA AAT GCC   180
38    Val Asp Val Gly Gly Ser Pro Lys Asp Gly Tyr Asn Val Asn Ala   52
181   GAT GTC CGT AAA AAT ATT TGG ACC AGC GAC AAT GGC AGA CAT TCG   225
53    Asp Val Arg Lys Asn Ile Trp Thr Ser Asp Asn Gly Arg His Ser   67
226   TTT GAT GCC ACA GCA GGT TAT GGC CAG CAC TTG GGT GGA CCC TAT   270
68    Phe Asp Ala Thr Ala Gly Tyr Gly Gln His Leu Gly Gly Pro Tyr   82
271   GGC AAT AGT CGT CCT GAT TAC CGT GGC GGT GGC ATT TAC ACC TAC   315
83    Gly Asn Ser Arg Pro Asp Tyr Arg Gly Gly Gly Ile Tyr Thr Tyr   97
316   AGA TGG [TAG] ATT AAT CTA AAA AAA CTA TGT AAA TTG TTT TTC CAA   360
98    Arg Trp End
361   AAT AAT AAA ATT AAC AGT TTT GCT ATG TGA TCA AAT TCA AAA AAA   405
406   AAA   408
```

图 1　家蝇 *MdDpt* cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　The complete nucleotide and deduced amino acid sequences of *MdDpt* from *Musca domenstica*

ATG 和 TAG 分别表示起始密码子和终止密码子，AAT AAA 为加尾信号。ATG and TAG indicate the start site and the stop codon respectively, the letters in shadow(AAT AAA) indicate the polyadenylation signal.

```
                 信号肽 Signal peptide                    P结构域 P-domain
MdDpt   MKYLCAIVLLCALSAT---------FVVADDKS---QPP--------------PPQIKDPQVR
ScDpt   MKFFGLYLLVACILA------------LAHATP---QSP--------------PAQIKDPKIY
PtDpt   MKLFYLLVLCALSLA-----------VMADEKPKLILPT--------------PAPPNLTQLV
DpDpt   MEFSSSLLLLSLACACACLCAPAAAYPLADEQHLVYVEPSEFSPDFIDVEVDHPRVRRQLQLQ
ScDpt
                                 G结构域 G-domain
MdDpt   VDVGGSPKDGYNVNADVRKNIWTSDNGRHSFDATAGYGQHLGGPYGNSRPDYRGGGIYTYRW-
ScDpt   ASGGGSPKDGYNVNVDVRKNVWESQNGRHSIDATGGYSQHLGGPYGNSRPDFRGGASYTYRF-
PtDpt   GGGGGNRKDGFGVSVDAHQKVWTSDNGRHSIGVTPGYSQHLGGPYGNSRPDYRIGAGYSYNFG
DpDpt   GGGGGSPRQGFDLSLNGRAPVWQSPNGRHSFDATGHYGQHLGGPYGNSRPQWGAGGQYTFRF-
```

图 2　家蝇 *MdDpt* 氨基酸序列与其他蝇类同源序列的比对分析

Fig. 2　Multiple alignment of amino acid sequences of *Musca domenstica* diptericin with diptericins of other flies

MdDpt：家蝇 *Musca domenstica*（GenBank accession no. FJ794602）；*ScDpt*：厩蝇 *Stomoxys calcitrans*（AAY98016）；*PtDpt*：新陆原伏蝇 *Protophormia terraenovae*（X15851）；*DpDpt*：拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura*（XM_001360644）.

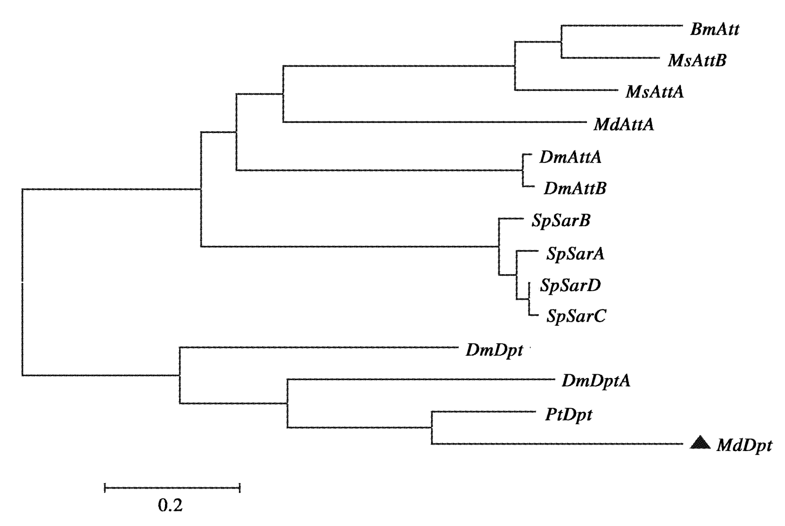


图 3　Attacin_C 超家族抗菌肽系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree of the Attacin_C superfamily

MdDpt：家蝇双翅肽 *Musca domestica* diptericin（FJ794602）；*MdAttA*：家蝇攻击素 *Musca domestica* attacin（AAY59540）；*DmAttA*：黑腹果蝇攻击素 A *Drosophila melanogaster* attacin A（NP_523745）；*DmAttB*：黑腹果蝇攻击素 B *Drosophila melanogaster* attacin B（AAF58214）；*BmAtt*：家蚕攻击素 A *Bombyx mori* attacin A（AAB34519）；*MsAttA*：烟草天蛾攻击素 A *Manduca sexta* attacin A（AAY82587）；*MsAttB*：烟草天蛾攻击素 B *Manduca sexta* attacin B（AAO74640）；*DmDptA*：黑腹果蝇攻击素 A *Drosophila melanogaster* diptericin A（AAA28466）；*PtDpt*：新陆原伏蝇双翅肽 *Protophormia terraenovae* diptericin（CAB57822）；*DmDpt*：黑腹果蝇双翅肽 B *Drosophila melanogaster* diptericin B（AAK17201）；*SpSarA*：棕尾别麻蝇麻蝇素Ⅱ A *Sarcophaga peregrina* sarcotoxin Ⅱ A（BAA14184）；*SpSarB*：棕尾别麻蝇麻蝇素Ⅱ B *Sarcophaga peregrina* sarcotoxin Ⅱ B（BAA14183）；*SpSarC*：棕尾别麻蝇麻蝇素Ⅱ C *Sarcophaga peregrine* sarcotoxin Ⅱ C（BAA14185）；*SpSarD*：棕尾别麻蝇麻蝇素Ⅱ D *Sarcophaga peregrina* sarcotoxin Ⅱ D（AAA29987）.

2.2　*MdDpt* 基因经菌刺激后表达分析

应用半定量 RT-PCR 技术，对大肠杆菌刺激后家蝇体内 *MdDpt* 基因的表达量变化进行检测，结果见图 4。数据分析表明在未经诱导的家蝇幼虫体内 *MdDpt* 基因的表达量很低，经过大肠杆菌刺激后 *MdDpt* 基因表达迅速上调，在 12 h 达到高峰，随后逐渐恢复，72 h 后趋于恢复向正常水平，通过 *t* 检验，*MdDpt* 基因表达量在 6 ~ 72 h 后均高于未刺激的对照组，且具有显著性差异（$P < 0.01$）（图 5）。

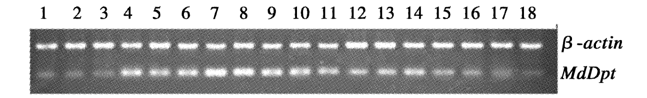


图 4　大肠杆菌刺激后不同时间 *β-actin* 和 *MdDpt* PCR 产物的电泳分析

Fig. 4　Electrophoresis result of *β-actin* and *MdDpt* PCR products after challenged with *Escherichia coli*

1 – 3：未经大肠杆菌处理的空白对照组（The blank control group without *Escherichia coli* challenge）；4 – 6：刺激后 6 h（6 h after *E. coli* challenged）；7 – 9：刺激后 12 h（12 h after *E. coli* challenged）；10 – 12：刺激后 24 h（24 h after *E. coli* challenged）；13 – 15：刺激后 48 h（48 h after *E. coli* challenged）；16 – 18：刺激后 72 h（72 h after *E. coli* challenged）.

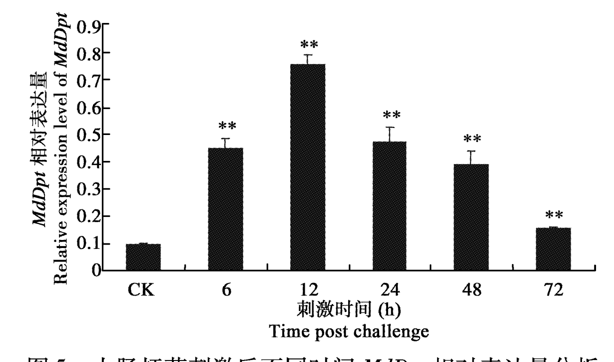


图 5　大肠杆菌刺激后不同时间 *MdDpt* 相对表达量分析

Fig. 5　*MdDpt* expression profile after challenged with *Escherichia coli*

图中数值为均数 ± 标准差；** 表示与对照差异极显著（*t* 检验，$P < 0.01$）。The value in figure is mean ± *SD*; ** denotes significant difference between the treatment and the control（*t*-test, $P < 0.01$）.

3　讨论

根据氨基酸组成和结构特征，一般可以把昆虫抗细菌肽分为 4 类，即形成两性分子 α-螺旋的抗细菌肽类、有分子内二硫桥的抗细菌肽类、富含脯氨酸的抗细菌肽类及富含甘氨酸的抗细菌多肽类（Hoffmann and Hetru，1992）。双翅肽（diptericin）最早由 Dimarcq 等（1988）从经细菌诱导的新陆原伏蝇 *Phormia terranovae* 幼虫的血淋巴中分离得到，并证

实其参与昆虫的体液免疫防御且发挥着十分重要作用。本文从家蝇中克隆了双翅肽基因，一级结构和分子系统学分析表明，*MdDpt* 应属于 Attain_C 超家族。Attain_C 超家族抗菌肽的 C 端都有一个或两个富含甘氨酸的结构域——G 结构域(G-domain)，因此也被称为富含甘氨酸的一类抗菌肽(glycine-rich antibacterial peptide)，此类抗菌肽被认为主要抗 G^- 菌，也有抗 G^+ 菌(Brey *et al*., 1988)。分析表明 Attain_C 超家族抗菌肽除 C 端的 G 结构域外，在其 N 端还常含有一个短的富含脯氨酸的结构域(P-domain)，*MdDpt* 也不例外，这提示富含甘氨酸的抗菌肽与富含脯氨酸的抗菌肽在进化上似乎具有一定关联(Hedengren *et al*., 2000)。与 Attacin 和 Sarcotoxin Ⅱ 相比，Diptericin 分子量最小，C 端只含有一个 G 结构域，在系统进化树上，Diptericin 与 Attacin/Sarcotoxin Ⅱ 家族成员之间具有明显的界限。

基因定量研究表明，*MdDpt* 对大肠杆菌刺激能够作出快速应答，说明 *MdDpt* 在家蝇防御微生物感染时起着积极作用，这与前人的研究结果是一致的(Lee *et al*., 2001; Altincicek *et al*., 2009)。渠晖等(2007)根据果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 Diptericin 保守区设计引物，利用 RT-PCR 方法研究了家蝇体内 Diptericin 基因的表达量情况，也得到了类似的结果。众多研究表明昆虫 Diptericin，Attacin 和 Sarcotoxin Ⅱ 三类富含甘氨酸的抗菌肽无论从分子结构、抗菌活性和调控过程方面均存在一定的相似性，或许还存在某种协同关系，深入了解它们的进化与功能对于探索家蝇防御机制具有重要意义。

参 考 文 献(References)

Altincicek B, Vilcinskas A, 2009. Septic injury-inducible genes in medicinal maggots of the green blow fly *Lucilia sericata*. *Insect Mol. Biol*., 18(1): 119 – 125.

Brey PT, Hultmark D, 1988. Molecular mechanisms of immune responses in insects. Chapman & Hall, London. 40 – 66.

Dimarcq JL, Keppi E, Dunbar B, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Rankine SM, Fothergill JE, Hoffmann JA, 1988. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranovae* and complete amino-acid sequence of the predominant member, diptericin A. *Eur. J. Biochem*., 171: 17 – 22.

Geng H, An CJ, Hao YJ, Li DQ, 2004. Molecular cloning and expression of Attacin from housefly (*Musca domestica*). *Acta Genetica Sinica*, 31(12): 1 344 – 1 350. [耿华，安春菊，郝友进，李德森，杜荣骞，2004. 家蝇攻击素(Attacin)基因的克隆与表达. 遗传学报，31(12): 1 344 – 1 350]

Hoffmann JA, Hetru C, 1992. Insect defensins: Inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today*, 10: 411 – 415.

Hedengren M, Borge K, Hultmark D, 2000. Expression and evolution of the *Drosophila* attacin/diptericin gene family. *Biochem Biophys. Res. Commun*., 279: 574 – 581.

Jin XB, Xu QY, Xu JH, Zhu JY, 2004. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding cecropin, an antimicrobial peptide from *Musca domestica* larvae. *China Tropical Medicine*, 4(6): 903 – 907. [金小宝，许琴英，徐建华，朱家勇，2004. 家蝇幼虫天蚕素基因的克隆与序列分析. 中国热带医学，4(6): 903 – 907]

Lee JH, Cho KS, Lee J, Yoo J, Lee J, Chung J, 2001. Diptericin-like protein: an immune response gene regulated by the anti-bacterial gene induction pathway in *Drosophila*. *Gene*, 271(2): 233 – 138.

Liu FS, Liu YC, Li FH, Dong B, Xiang JH, 2005. Molecular cloning and expression profile of putative anti-lipopolysaccharide factor (ALF) in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mar. Biotech*., 7(6): 600 – 608.

Mohammad FV, Noorwala M, Ahmad VU, Sener B, 1995. A bidesmosidic triterpenoidal saponins from the roots of *Symphytum officinale*. *Planta Med*., 61: 94.

Qu H, Hao YJ, Jing YJ, Li DS, Du RQ, 2007. The expression of correlative genes of antibacterial materials in house fly larvae. *Chin. J. Bioprocess Eng*., 5(4): 14 – 18. [渠晖，郝友进，荆迎军，李德森，杜荣骞，2007. 家蝇幼虫抗菌活性物质相关基因表达情况. 生物加工过程，5(4): 14 – 18]

Wang LC, Wang JX, Wang LY, Zhao XF, 2003. Cloning and sequence analysis of the full-length cDNA encoding defensin, an antimicrobial peptide from the housefly (*Musca domestica*). *Acta Zool. Sin*., 49(3): 408 – 413. [王来城，王金星，王来元，赵小凡，2003. 家蝇防御素基因的 cDNA 克隆及序列分析. 动物学报，49(3): 408 – 413]

Zhai CY, 1996. The progress of studies on insect antibacterial proteins. *Acta Entomol. Sin*., 39(1): 99 – 104. [翟朝阳，1996. 昆虫抗菌物质研究进展. 昆虫学报，39(1): 99 – 104]

(责任编辑：邓艳)